

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21620121152373

UDC____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

营养盐限制下海洋硅藻油脂的积累及能源
硅藻牟氏角毛藻的规模化培养

Lipid productivity of marine diatoms under
nutrients-limitations and pilot-scale culture of the marine
diatom *Chaetoceros muelleri*

卓文豪

指导教师姓名: 梁君荣副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录	
摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 生物柴油概况.....	1
1.1.1 生物柴油的优势	1
1.1.2 生物柴油的发展	2
1.2 微藻生物柴油研究进展.....	4
1.2.1 微藻的优势	4
1.2.2 微藻的油脂及脂肪酸组成	5
1.2.3 微藻油脂的检测	7
1.3 微藻生物柴油的制备流程.....	9
1.3.1 优良藻种的筛选	9
1.3.2 微藻的培养	10
1.3.2 微藻的采收	12
1.3.3 微藻生物柴油酯交换技术	13
1.4 硅藻制备生物柴油的优势.....	15
1.5 环境因素对微藻油脂积累的影响.....	16
1.5.1 营养盐	16
1.5.2 二氧化碳	18
1.5.3 温度	18
1.5.4 光照	19
1.6 本论文主要研究内容和意义.....	19
第二章 材料与方 法	21
2.1 实验材料.....	21
2.1.1 藻种与培养基	21
2.1.2 主要仪器设备	22
2.2 实验方法.....	23

2.2.1 营养盐限制下硅藻油脂的积累	23
2.2.1.1 硅藻的保种	23
2.2.1.2 实验流程设计	23
2.2.1.3 硅藻生物量与 OD680 的线性关系测定	24
2.2.1.4 硅藻生物量的测定	24
2.2.1.5 硅藻叶绿素 a (chl _a)含量的测定	24
2.2.1.6 硅藻培养基营养盐的测定	24
2.2.1.7 硅藻 BODIPY505/515 染色观察	27
2.2.1.8 硅藻中性脂积累情况跟踪	27
2.2.1.9 硅藻油脂含量的测定	27
2.2.1.10 硅藻脂肪酸组成分析	28
2.2.1.11 数据分析	28
2.2.2 牟氏角毛藻规模化培养	29
2.2.2.1 规模化培养的步骤	29
2.2.2.2 牟氏角毛藻的单批培养与半连续培养	30
2.2.2.3 牟氏角毛藻生物量的测定	31
2.2.2.4 牟氏角毛藻的采收	31
2.2.2.5 牟氏角毛藻灰分含量的测定	31
2.2.2.6 牟氏角毛藻油脂含量的测定	31
2.2.2.7 牟氏角毛藻固碳率的测定	31
2.2.2.8 DIC 含量的测定	32
第三章 实验结果	33
3.1 营养盐限制下威氏海链藻油脂的积累	33
3.1.1 威氏海链藻生物量与 OD680 的线性关系	33
3.1.2 威氏海链藻培养基中营养盐的消耗情况	33
3.1.3 威氏海链藻在各营养盐限制下的生长曲线	37
3.1.4 威氏海链藻叶绿素 a 含量的变化	38
3.1.5 威氏海链藻中性脂积累的染色观察	39
3.1.6 威氏海链藻中性脂含量的积累情况	41

3.1.7 威氏海链藻在各营养盐限制下的油脂含量	43
3.1.8 威氏海链藻在各营养盐限制下的油脂产率	44
3.1.9 威氏海链藻在各营养盐限制下的脂肪酸组成	45
3.2 营养盐限制下牟氏角毛藻的油脂积累.....	47
3.2.1 牟氏角毛藻生物量与 OD680 的关系	47
3.2.2 牟氏角毛藻培养基中营养盐消耗情况	47
3.2.3 牟氏角毛藻在各营养盐限制下的生长曲线	50
3.2.4 牟氏角毛藻叶绿素 a 含量的变化	51
3.2.5 牟氏角毛藻中性脂积累的染色观察	52
3.2.6 牟氏角毛藻中性脂含量的积累情况	54
3.2.7 牟氏角毛藻在各营养盐限制下的油脂含量	55
3.2.8 牟氏角毛藻在各营养盐限制下的油脂产率	57
3.2.9 牟氏角毛藻在各营养盐限制下的脂肪酸组成	58
3.3 牟氏角毛藻规模化培养.....	59
3.3.1 牟氏角毛藻单批培养下的生长曲线	59
3.3.2 牟氏角毛藻单批培养下的灰分含量与油脂含量	60
3.3.3 牟氏角毛藻单批培养下的固碳率	61
3.3.4 牟氏角毛藻半连续培养下的生长曲线	62
3.3.5 牟氏角毛藻半连续培养下的灰分含量与油脂含量	64
3.3.6 牟氏角毛藻半连续培养下的固碳率	65
3.3.7 牟氏角毛藻规模化培养下的油脂产率	66
第四章 讨论	67
4.1 营养盐限制对硅藻油脂积累.....	67
4.1.1 N 限制对目标硅藻油脂积累的影响	68
4.1.2 P 限制对目标硅藻油脂积累的影响	69
4.1.3 Si 限制对目标硅藻油脂积累的影响	71
4.1.4 营养盐综合限制对目标硅藻油脂积累的影响	72
4.2 营养盐限制对微藻脂肪酸组成的影响.....	73
4.2.1 营养盐限制对威氏海链藻脂肪酸组成的影响	73

4.2.2 营养盐限制对牟氏角毛藻脂肪酸组成的影响	74
4.3 牟氏角毛藻的单批培养与半连续培养.....	75
4.4 CO ₂ 对牟氏角毛藻固碳率及油脂含量的影响.....	75
第五章 总结与展望	78
5.1 研究总结	78
5.2 展望	79
参考文献	81
在学期间参与课题与论文发表	91
致 谢	92

Contents

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	错误!未定义书签。
Chapter 1. Introduction	1
1.1 Biodiesel	1
1.1.1 Advantages of biodiesel.....	1
1.1.2 Development of biodiesel.....	2
1.2 Microalgae for biofuel production	4
1.2.1 Advantages of microalgae	4
1.2.2 Lipid content and fatty acid composition of microalgae	5
1.2.3 Lipid detection of microalgae.....	7
1.3 Procedure of microalgae biofuel production	9
1.3.1 Selection of microalgae strain	9
1.3.2 Scale-culture of microalgae	10
1.3.3 Harvest of microalgae.....	12
1.3.4 Transesterification of microalgae biofuel.....	13
1.4 Advantages of diatoms for biofuel production	15
1.5 Effects of environment factors on the microalgae lipid accumulation ..	16
1.5.1 Nutrients	16
1.5.2 Carbon dioxide	18
1.5.3 Temperature.....	18
1.5.4 Light	19
1.6 Purpose and significance of this study	19
Chapter 2. Materials and methods	21
2.1 Materials	21
2.1.1 Diatom strain and culture medium	21
2.1.2 Instruments	22
2.2 Methods	23

2.2.1 Diatom lipid accumulation under nutrient-limitations	23
2.2.1.1 Culturing	23
2.2.1.2 Design of experiments	23
2.2.1.3 Curve of OD680 and biomass	24
2.2.1.4 Determination of the biomass	24
2.2.1.5 Determination of chlorophyll a	24
2.2.1.6 Determination of nutrients consumption	24
2.2.1.7 Microscopic images of diatoms stained with BODIPY505/515	27
2.2.1.8 Determination of neutral lipid using BODIPY505/515	27
2.2.1.9 Determination of lipid content	27
2.2.1.10 Analysis of fatty acid composition	28
2.2.1.11 Statistics	28
2.2.2 Pilot-scale culture of <i>Chaetoceros muelleri</i>	29
2.2.2.1 Procedure of pilot-culture	29
2.2.2.2 Semicontinuous culture of <i>Chaetoceros muelleri</i>	30
2.2.2.3 Determination of the biomass	31
2.2.2.4 Harvest of <i>Chaetoceros muelleri</i>	31
2.2.2.5 Determination of ash content	31
2.2.2.6 Determination of lipid content	31
2.2.2.7 Determination of CO ₂ bio-fixation	31
2.2.2.8 Determination of DIC content	32
Chapter 3. Results	33
3.1 Lipid accumulation of <i>Thalassiosira weissflogii</i> under different nutrients limitations	33
3.1.1 Curve of OD680 and biomass of <i>Thalassiosira weissflogii</i>	33
3.1.2 Consumption of medium nutrients	33
3.1.3 Growth of <i>Thalassiosira weissflogii</i> under nutrient-limitations.....	37
3.1.4 Changes of chlorophyll a under different nutrient-limitations	38

3.1.5	Microscopic images of diatoms stained with BODIPY505/515	39
3.1.6	Changes of neutral lipid under different nutrient-limitations	41
3.1.7	Lipid contents of <i>Thalassiosira weissflogii</i> under different nutrient-limitations	43
3.1.8	Lipid productivity of <i>Thalassiosira weissflogii</i> under different nutrient-limitations	44
3.1.9	Fatty acid composition of diatoms under different nutrient-limitations	45
3.2	Lipid accumulation of <i>Chaetoceros muelleri</i> under nutrient-limitations	47
3.2.1	Curve of OD680 and biomass of <i>Chaetoceros muelleri</i>	47
3.2.2	Consumption of medium nutrients	47
3.2.3	Growth of <i>Chaetoceros muelleri</i> under nutrient-limitations	50
3.2.4	Changes of chlorophyll a of <i>Chaetoceros muelleri</i>	51
3.2.5	Microscopic images of <i>Chaetoceros muelleri</i> stained with BODIPY505/515	52
3.2.6	Changes of neutral lipid under different nutrient-limitations	54
3.2.7	Lipid contents of <i>Chaetoceros muelleri</i> under different nutrient-limitations	55
3.2.8	Lipid productivity of <i>Chaetoceros muelleri</i> under different nutrient-limitations	57
3.2.9	Fatty acid composition of <i>Chaetoceros muelleri</i> under different nutrient-limitations	58
3.3	Pilot-scale culture of <i>Chaetoceros muelleri</i>	59
3.3.1	Growth curve of <i>Chaetoceros muelleri</i> by batch culture	59
3.3.2	Lipid and ash content of <i>Chaetoceros muelleri</i> by batch culture	60
3.3.3	CO ₂ biofixation of <i>Chaetoceros muelleri</i> by batch culture	61
3.3.4	Growth curve of <i>Chaetoceros muelleri</i> by semicontinuous culture	62
3.3.5	Lipid and ash content of <i>Chaetoceros muelleri</i> by semicontinuous	

culture.....	65
3.3.6 CO ₂ biofixation of <i>Chaetoceros muelleri</i> by semicontinuous culture	67
3.3.7 Lipid productivity of <i>Chaetoceros muelleri</i> by pilot-scale culture	67
Chapter 4. Discussion	67
4.1 Effects of nutrient-limitations on the lipid accumulation of diatoms....	67
4.1.1 Effects of N-limitation on the lipid accumulation of diatoms.....	67
4.1.2 Effects of P-limitation on the lipid accumulation of diatoms.....	68
4.1.3 Effects of Si-limitation on the lipid accumulation of diatoms.....	69
4.1.4 Effects of nutrients-limitation on the lipid accumulation of diatoms.	71
4.2 Effects of nutrient-limitations on the fatty acid composition of diatoms	72
4.2.1 Effects of nutrient-limitations on the fatty acid composition of <i>Thalassiosira weissflogii</i>	72
4.2.2 Effects of nutrient-limitations on the fatty acid composition of <i>Chaetoceros muelleri</i>	73
4.3 Batch culture and semicontinuous culture of <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivated with 10% CO₂	73
4.4 Effects of CO₂ on the carbon biofixation and lipid content of <i>Chaetoceros muelleri</i>	74
Chapter 5. Conclusion and prospect.....	77
5.1 Conclusion.....	77
5.2 Prospect.....	78
References.....	81
Published papers and participated research projects.....	91
Acknowledgements.....	错误!未定义书签。

摘要

微藻具有光合效率高、生长繁殖快、环境适应能力强、油脂含量高等诸多优点，因此成为新能源开发的一大热点。海洋硅藻是一类重要的微藻，其生产力约占海洋初级生产力的 40%，在全球碳循环中的作用堪比所有热带雨林的总和。硅藻种类繁多、分布广泛、油脂含量高且容易培养，具有开发为生物柴油的巨大潜力。

本论文选用海洋硅藻威氏海链藻与牟氏角毛藻为研究对象，研究其在不同营养盐限制下的生长变化、中性脂积累、油脂产率及脂肪酸组成，获得既能平衡生物量生长，又能诱导油脂积累的培养条件。同时，利用 10% CO₂ 通气，规模化培养牟氏角毛藻，计算其生物量产率及油脂产率，讨论其开发应用于生物柴油的可行性。主要研究结果如下：

- 1) N、P 限制均能有效促进威氏海链藻细胞富积中性脂。Si 限制则主要促进非中性脂的积累。威氏海链藻对照组、N、P、Si 及综合营养盐限制组的油脂含量分别为 26.85% DW, 34.79% DW, 34.32% DW, 33.04% DW 及 42.99% DW。营养盐限制会改变脂肪酸的组成，表现为多不饱和脂肪酸(PUFA)含量下降，饱和脂肪酸(SFA)及单不饱和脂肪酸(MUFA)含量上升。对于威氏海链藻，P 限制下油脂产率最高，为 15.10 mg/L/d。
- 2) 牟氏角毛藻 N 限制及综合营养盐限制组的油脂含量较高，分别为干重的 35.03% DW 和 33.54% DW。P、Si 限制组及对照组的油脂含量均较低，分别为 26.74% DW, 24.82% DW 和 22.23% DW。N、P、Si 限制均促进了牟氏角毛藻中性脂的积累，此外 N 限制还促进了非中性脂的积累。营养盐限制会改变脂肪酸的组成，表现为多不饱和脂肪酸(PUFA)含量下降，饱和脂肪酸(SFA)及单不饱和脂肪酸(MUFA)含量上升。而对牟氏角毛藻，N 限制下获得的油脂产率最高，达 29.07 mg/L/d。
- 3) 利用 10% CO₂ 通气，规模化培养牟氏角毛藻既能获得较高生物量，又能积累较高的油脂。半连续培养方式比单批培养方式能获得更大的生物量产率及油脂产率。半连续培养条件下，通 10% CO₂ 组的油脂含量为 31% DW，油脂产率为 33.70 mg/L/d; 单批培养条件下，通 10% CO₂ 组的油脂含量为 40.37% DW，

但油脂产率较低，为 21.41 mg/L/d；通空气组的无论是在半连续条件下还是单批培养条件下，油脂含量和油脂产率均较低。所以在 10% CO₂ 通气下，采用半连续培养方式，牟氏角毛藻可获得最高油脂产率。

- 4) 综上所述，牟氏角毛藻为具有较大开发潜力的能源硅藻。特别是在氮限制或高 CO₂ 浓度培养下，可获得较高的油脂产率。

关键词：生物柴油；海洋硅藻；油脂产率；营养盐限制； CO₂ 固定

Abstract

Microalgae have got more and more attention as one of the best potential feedstocks for biodiesel production due to their various growth characteristics and high lipid accumulation. Marine diatoms, which are the most important eukaryotic phytoplankton for carbon sequestration today, contribute more than 40% of the global oceanic organic carbon production per year. And their roles in global cycling can be comparable to all terrestrial rain forests combined. Diatoms are species-variety and widely distributed. They also have high lipid contents and easy to be cultured. Therefore, marine diatoms may be considered particularly attractive feedstocks for biofuel production.

In this study, biomass, lipid accumulation, and lipid productivity of the marine diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleris* under various nutrients limitation were investigated. The potential for biodiesel production were also evaluated for *C. muelleri* with 10% CO₂ aeration at polit-scale culture condition. The main results as showed as following:

- 1) N and P-limitation can induce the neutral lipid accumulation in *T. weissflogii* effectively while Si-limitation contributed to non-neutral lipid accumulation. The lipid contents of *T. weissflogii* under replete, N-, P-, Si- and synergistic-limited were 26.85% DW, 34.79% DW, 34.32% DW, 33.04% DW, and 42.99% DW, respectively. The decrease of percentage of PUFA accompanied with the increase of percentage of SFA and MUFA were found in nutrients-limited treatments. Highest lipid productivity of 15.10 mg/L/d was obtained under P-limitation.
- 2) More total lipid contents were accumulated under N- and synergistic--limitation in *C. muelleri* which were 35.03% DW and 33.54% DW. However, more neutral lipid accumulation were detected under N-, P-, and Si-limitation conditions. The same change tendency of fatty acid compositions were found in *C. muelleri* and *T. weissflogii*. Highest lipid

productivity of 29.07 mg/L/d could be obtained under N-limitation in *C. muelleri*.

- 3) *C. muelleri* cultivated with 10% CO₂ aeration could obtain more biomass and more lipids accumulation compared with air aeration. Biomass and lipid content of *C. muelleri* can be affected by culture mode. Lipid content and lipid productivity of *C. muelleri* cultivated with 10% CO₂ were 31% DW and 33.70 mg/L/d using semicontinuous culture way, while there were 40% DW and 21.41 mg/L/d using batch culture way.
- 4) In conclusion, *C. muelleri* cultured under N-limited condition or with 10% CO₂ aeration could be effective way for biofuel production.

Keywords: biodiesel; marine diatom; lipid productivity; nutrients-limitation; carbon dioxide fixation

第一章 前言

1.1 生物柴油概况

随着全球经济的快速发展，能源需求日益突出。据英国石油公司 BP 的最新统计，2014 年在全球的主要能源消耗中，化石能源贡献了约 86.7%（其中石油 32.9%，煤 30.1%，天然气 23.7%），而核能和水力发电只占了 4.4%和 6.7%^[1]。化石能源主要是指石油、煤碳、天然气等埋藏在地下和海洋底部的不可再生能源。然而，随着世界工业化程度的日益扩大，能源消耗急剧增长，这些不可再生的传统化石能源开发和利用正面临着严峻的挑战^[2, 3]。2010 年，全球原油消耗量约合 8704 万桶/d，据英国石油公司（BP）预测，到 2035 年全球能源需求将在此基础上增加 41%，二氧化碳排放量将增加 29%^[4]。由此可见，化石能源的使用将使温室气体不断增加，加剧温室效应，导致全球变暖。同时，化石能源的大量使用还会产生巨量的有毒有害气体，引发空气污染、海洋酸化、酸雨等问题^[5, 6]。英国与荷兰的研究结果显示：21 世纪由于全球变暖引发的气候异常、干旱、洪水等灾害所造成的经济损失将达到 460 万亿美元，而 2012 年全球的经济规模也只有 70 万亿美元^[4, 7]。面对化石能源的大量消耗引起的能源危机及环境污染等问题，开发可持续性、环境友好型的清洁能源成为 21 世纪世界各国面临的重要任务。生物能源的概念便是在这样的时代背景下提出的。生物能源是指通过生物的活动，将生物质、水或其他无机物转化为沼气、氢气等可燃气体或乙醇、油脂类可燃液体为载体的可再生能源。

1.1.1 生物柴油的优势

生物柴油之所以受到广泛的关注，是因为它具备以下优势：

- 1) 从性能上讲，生物柴油具有低温启动性：和传统石化柴油相比，生物柴油具有良好的发动机低温启动性能，冷滤点达到-20℃。高润滑性能：与传统石化柴油相比，可以减少发动机供油系统和缸套之间的摩擦，增加发动机的使用寿命，降低发动机的成本。高燃性：生物柴油的十六烷值高于传统石化柴油，因此具有更好的燃烧抗爆性能，可以采用更高压缩比的发动机来提高其燃烧效率。其次，生物柴油中所含的氧元素能促进燃烧，可以提高发动机的热效

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.